

Patent number: JP5025053
Publication date: 1993-02-02
Inventor: YAMAMOTO TATSUO; others: 02
Applicant: SEKISUI CHEM CO LTD
Classification:
- international: A61K35/66
- european:
Application number: JP19910337009 19911219
Priority number(s):

[View INPADOC patent family](#)

Abstract of JP5025053

PURPOSE: To provide the title safe composition obtained by using, as raw material, a culture solution for actinomycete, *Streptomyces nobilis* or a solvent extract from a product obtained by evaporating said solution to dryness.

CONSTITUTION: The objective composition consisting of (A) a culture solution for actinomycete, *Streptomyces nobilis*, a kind of the stored bacteria (JCM 4274) in the Institute of Physical and Chemical Research or (B) a substance obtained by extracting with an organic solvent such as ethyl acetate or methanol a product obtained by evaporating said solution to dryness. The composition gives marked allergic inflammation-inhibitory activity.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平5-25053

(43) 公開日 平成5年(1993)2月2日

(51) Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 35/66	A B F	9165-4C		
// C 1 2 P 1/06		Z 2114-4B		
(C 1 2 P 1/06				
C 1 2 R 1:465)				

審査請求 未請求 請求項の数1(全 6 頁)

(21) 出願番号	特願平3-337009	(71) 出願人	000002174 積水化学工業株式会社 大阪府大阪市北区西天満2丁目4番4号
(22) 出願日	平成3年(1991)12月19日	(72) 発明者	山本 達夫 大阪府高槻市八丁西町3-19
(31) 優先権主張番号	特願平2-405009	(72) 発明者	栗山 澄 大阪府高槻市野見町6-46
(32) 優先日	平2(1990)12月21日	(72) 発明者	清水 達丈 京都府京都市中京区油小路通御池上ル押油 小路町 254
(33) 優先権主張国	日本 (J P)		

(54) 【発明の名称】 アレルギー性炎症抑制剤用組成物

(57) 【要約】

【目的】 原材料として放線菌 S. ノビリスを用いてアレルギー性炎症抑制剤用組成物を得る。

【構成】 アレルギー性炎症抑制剤用組成物は、放線菌ストレプトマイセス・ノビリス (*Streptomyces nobilis*) の培養液またはその乾固物から有機溶剤によって抽出された物質よりなる。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 放線菌ストレプトマイセス・ノビリス (*Streptomyces nobilis*) の培養液またはその乾固物から有機溶剤によって抽出された物質よりなるアレルギー性炎症抑制剤用組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、放線菌ストレプトマイセス・ノビリス (以下、「S. ノビリス」と略記する) の培養液またはその乾固物から有機溶剤によって抽出された物質よりなるアレルギー性炎症抑制剤用組成物に関する。

【0002】

【従来の技術】アレルギーは、ある抗原との2度目の接触の際に生じる免疫反応が、個々人によって過度にあるいは不適当な形で現われる一種の病的症状であって、関与する抗体の性質の違いからI型、II型、III型およびIV型の反応に分類されている。これら4つの型のうち、III型反応 (免疫複合体反応: アルサス反応) およびIV型反応 (細胞性免疫反応: 遅延型過敏症反応) に関与するアレルギー性炎症反応は慢性関節リウマチのような自己免疫疾患、更には肝炎、腎炎、感染症のような種々の炎症性疾患の発症進展に重要な役割を演じていることが明らかになってきた。

【0003】ところで、従来より放線菌培養濾液中には種々の抗生物質が見つけられており、該培養濾液は生理活性物質の宝庫と言われている。しかしながら、アレルギー性炎症を抑制する物質は、現在までのところ放線菌培養濾液から見つけられた例がない。

【0004】また、従来の抗炎症剤であるアスピリンやインドメタシンはアレルギー性炎症に対して抑制作用が極めて弱いという問題点がある。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、このような実情から、原材料として放線菌S. ノビリスを用8て得られるアレルギー性炎症抑制剤用組成物を提供することにある。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、III型およびIV型アレルギーに対するアレルギー性炎症抑制物質を見つけ出すために、III型アレルギー反応の動物モデルであるラット4時間異種受身皮膚アナフィラキシー (4時間heterologous PCA) 反応、IV型アレルギー反応の動物モデルであるマウス遅延型過敏症 (DTH) 反応および慢性関節リウマチのモデルであるアジュバント関節炎を用いてスクリーニングを行った結果、放線菌S. ノビリスの培養液またはその乾固物の溶剤抽出物にアレルギー性炎症抑制作用を示す物質が含有されているという驚くべき事象を見出し、この知見に基づき本発明を完成するに至った。

2

【0007】すなわち、本発明によるアレルギー性炎症抑制剤用組成物は、放線菌S. ノビリスの培養液またはその乾固物から有機溶剤によって抽出された物質よりなるものである。

【0008】本発明組成物の原料である放線菌S. ノビリスは、公的保存機関から入手可能であり、たとえば理化学研究所の保存菌 (JCM 4274) (これは米国においてATCC 19252 およびオランダにおいてCBS 198.65としても保存) などの菌が使用できる。

10 【0009】放線菌S. ノビリスの培養は、然るべき栄養物を含んだ培地を用いて行う。液体培養の場合、その培地の成分としてはブドウ糖などの糖類、ペプトンや麦芽エキスなどのタンパク質類、ビタミン類、核酸類、アミノ酸類、複合糖質類の一種または数種を含んだ水溶液が好適に用いられる。代表的な培地例としては、澱粉・アンモニウム系の液体培地 (可溶性澱粉、 K_2HPO_4 、 NH_4Cl) を含む)

が挙げられる。液体培地のpHは5~9の範囲が好ましく、培養温度は20~40℃が好ましい。また液体培養の好ましい培養時間は3~14日である。固体培養の場合、主に上記の液体培養の培地にさらに寒天を含んだものを用いるが、固体培養の培養条件も液体培養のそれとほぼ同じである。こうして、S. ノビリスを培養した後、溶剤抽出処理を行う。溶剤抽出は、培養液をそのまま溶剤と接触させる方法、または培養液を蒸発乾固させ乾固物を溶剤と接触させる方法などによって行い、抽出相からアレルギー性炎症抑制剤の活性成分を取得する。溶剤抽出処理に際しては、該培養液またはその乾固物中にS. ノビリス菌体を存在させてもよいし、させなくてもよい。菌体を存在させずに抽出を行う場合は、培養液を固液分離し、その分離液相をそのままもしくはこれを乾固させたものを溶剤抽出処理に使用する。固液分離手段としては、遠心分離、濾過などが適宜用いられる。

【0010】アレルギー性炎症抑制活性成分の抽出溶剤としては有機溶剤が用いられる。この抽出処理用の有機溶剤の代表例としては、酢酸エチルなどのエステル類; メタノール、エタノール、n-プロパノール、イソプロパノール、n-ブタノールなどのアルコール類; エチルエーテル、ジオキサンなどのエーテル類; アセトン、メチルエチルケトンなどのケトン類などが挙げられるが、使用可能な溶剤はこれらに限定されない。また、上記溶剤の混合液を用いることもできる。特に好適な溶剤は酢酸エチル、メタノールなどである。

【0011】培養液をそのまま用いた抽出の場合、培養液と溶剤との比率は特に限定されないが、抽出効率および操作の容易さの観点から培養液1容あたり好ましくは溶剤0.5~2容の範囲である。培養液の乾固物を用いた抽出の場合、溶剤の使用量は特に限定されない。溶剤抽出は室温で行っても加熱下に行ってもよいが、後者の方が効率的である。加熱は常圧下での溶剤の沸点以下の

温度範囲で行う。抽出時間は溶剤の種類や抽出温度などによっても異なるが、好ましくは3～120分の範囲である。また抽出中は液を静置するかまたは時々攪拌しながら放置する。好ましくは、同一の培養液またはその乾固物に対して抽出操作を複数回繰り返す。

【0012】本発明組成物をアレルギー性炎症抑制剤に製剤化するには、通常はこれを製剤用担体と共に製剤組成物の形態とする。担体としては剤形に応じた薬剤を調製するのに通常使用される充填剤、崩壊剤、増量剤、結合剤、付湿剤、表面活性剤、滑沢剤などの稀釈剤あるいは賦形剤が例示される。また適当な溶剤を選定することにより、得られた溶剤抽出液ないしはその濃縮物をそのままの形態で外用液剤として使用することもできる。

【0013】本発明組成物を用いて製剤化されるアレルギー性炎症抑制剤の投与単位形態としては、上記の如き外用液剤の外、錠剤、丸剤、飲用液剤、散剤、懸濁剤、乳剤、顆粒剤、カプセル剤、坐剤、注射剤（液剤、懸濁剤など）、軟膏剤などが例示される。

【0014】アレルギー性炎症抑制剤中に含有すべき本発明組成物の量は、特に限定されず広範囲に適宜選択されるが、好ましくはアレルギー性炎症抑制剤中に0.1～50重量%の範囲である。

【0015】本発明組成物より得られたアレルギー性炎症抑制剤は、その使用に際し各種形態に応じた方法で投与される。たとえば上記の如き外用液剤の場合には、これを皮膚ないしは粘膜などの所要部位に直接塗布し、錠剤、丸剤、飲用液剤、懸濁剤、乳剤、顆粒剤およびカプセル剤の場合には経口投与され、注射剤の場合には静脈内、筋肉内、皮内、皮下もしくは腹腔内投与され、坐剤の場合には直腸内投与され、また軟膏剤の場合には塗布される。

【0016】本発明組成物より得られたアレルギー性炎症抑制剤の投与量は、使用目的、症状などにより適宜選択されるが、通常は1日当り本発明組成物として0.5～100mg/kg程度の範囲である。また上記製剤組成物を3～4回/日に別けて投与することももちろん差し支えない。

【0017】本発明組成物より得られたアレルギー性炎症抑制剤のヒトおよび動物に対する安全性については、後述の毒性試験結果からも明らかなように、全く問題がない。

【0018】

【実施例】つぎに、本発明の実施例を挙げて、上述した効果を実証する。

【0019】実施例（溶剤抽出物の調製）

理化学研究所から購入した放線菌S. ノビリス (JCM4274) 1白金耳を100mlの澱粉・アンモニウム培地（蒸留水100ml中に可溶性澱粉を1g、K₂HPO₄を0.05g、NH₄Clを0.05g含む）に接種し、30℃で7日間振盪培養した。この培養液を3,000

rpmで20分間遠心分離し、分離した上清液95mlを得た。この上清液を分液ロートに入れ、これに等量の酢酸エチルを加え、液全体を10分間振盪した。5分間静止後、水相と酢酸エチル相を分離した。分離した水相に等量の酢酸エチルを加え、上述の操作を繰り返し、再度水相と酢酸エチル相を分離した。分離した水相に等量の酢酸エチルを加え、上述の操作をもう一度繰り返し、3回目の抽出を行った。こうして3回の操作で得られた酢酸エチル相を集めて、集合液をエバポレータで濃縮乾固し、抽出物20mgを得た。

【0020】試験例1（III型アレルギー反応に対する作用）

i) ウサギ抗オボアルブミン (ovalbumin) 血清の調製
江田らの方法（日薬理誌、66巻、237頁、1970年）に準じて、つぎの手法でウサギ抗オボアルブミン血清を調製した。すなわち、生理的食塩水に溶解したオボアルブミン（Sigma社製）の2mg/ml溶液と完全フロイントアジュバント（Difco社製）との等量混合乳化液よりなる抗原液を調製した。この抗原液の0.5mlずつを体重約3kgのニュージーランド産ホワイト種の雄性家兎の左右臀筋内に1週間毎に4回注射した。最終注射の7日後に頸動脈から採血し、血清のみを分離取得し、ウサギ抗オボアルブミン血清とした。この抗血清のラット4時間異種受身皮膚アナフィラキシー (heterologous PCA) 反応の力価は1:32であった。

【0021】

ii) ラット4時間異種PCA反応（III型アレルギー性皮膚反応）に対する作用

実施例で得られた乾固状の抽出物を、最終濃度が10mg/mlになるように、5重量%アラビアゴム水溶液にジメチルスルホキシドを5重量%添加してなる溶液に懸濁した。こうして得られた懸濁液を供試液とした。被検動物としては体重120～200gのウイスター雄性ラットを用いた。

【0022】まず、上記供試液をラットに2ml/kg（抽出物量として20mg/kgラット）で腹腔内投与しておいた。

【0023】ついで供試液投与の20時間後に、上記ウサギ抗オボアルブミン血清を生理的食塩水で4倍に希釈してなる注射液0.05mlを、上記ラットの背部皮内に注射し、ラットを上記抗血清で感作した。

【0024】さらに、上記抗血清注射の3時間後に、上記供試液を感作ラットに2ml/kg（抽出物量として20mg/kgラット）で再度腹腔内投与した。

【0025】つぎに、2回目の供試液投与の1時間後に、対応する抗原として2mg/mlのオボアルブミンを含む0.5重量%エバンスブルー生理的食塩水を2.5ml/kg静脈内注射して、4時間異種PCA反応を惹起した。

【0026】こうして皮内反応を惹起した部位の漏出色

素を、Haradaらの方法

(J. Pharm. Pharmacol. 23巻、218頁、1971年)に従って抽出定量した。すなわち、抗原注射の1時間後に動物を屠殺し、4時間異種PCA反応部の皮膚を細切し、これを0.3% (w/v) Na₂SO₄水溶液3容とアセトン7容の混合液中に48時間浸漬放置し、漏出色素を抽出した。こうして抽出した色素を620nmで比色定量し、漏出色素量を求め、これをウサギ抗オパールブミン血清を注射した部位(site)当たりの漏出色素量(μ g)として表わした。

【0027】また、供試液として25mg/mlの最終濃度を有する液を調製し、この供試液のラットへの投与量を2ml/kg (抽出物量として50mg/kgラット)とし、その他の点は上記操作と同様に行って漏出色素量を求めた。

【0028】また、10mg/mlの最終濃度を有する供試液を用いた上記試験において、4時間異種PCA反応に当たり抗原注射から屠殺までの時間を30分とし、その他の点は上記操作と同様に行って漏出色素量を求めた。

【0029】この試験のコントロールとして、上記抽出物含有液の代わりに、上記溶剤抽出物を含まない上記ジメチルスルホキシド含有アラビアゴム水溶液を用い、その他の点は上記操作と同様に行って漏出色素量を求めた。

【0030】それぞれの試験(投与量20mg/kgラット、投与量50mg/kgラット、投与量20mg/kgラットとし抗原注射から屠殺までの時間を30分とした試験、およびコントロール)は、それぞれ5匹のラットを用いて行い、漏出色素量(μ g/site)はこれらラットについて得られた値の平均値をとった。

【0031】なお、コントロールは上記それぞれの試験毎にコントロール試験を行った。

【0032】この試験結果を図1、図2および図3にそれぞれ示す。なお、上記の投与量20mg/kgラットとし抗原注射から屠殺までの時間を30分とした試験の結果は、コントロールの漏出色素量に対する、供試液投与実験の漏出色素量の比率(%)で表わした。

【0033】これらの図から明らかなように、実施例の溶剤抽出物を含有する供試液を投与した群では、同抽出物を含有しない溶液を用いたコントロール群に比べ、ラット4時間異種PCA反応部の皮膚に漏出する色素量が大幅に減少し、顕著なアレルギー性炎症抑制活性が認められる。

【0034】試験例2 (IV型アレルギー反応に対する作用)

つぎの方法でマウスDTH反応での上記溶剤抽出物の作用を調べた。

【0035】まず、試験例1と同様の操作で濃度10mg/mlの抽出物含有供試液を調製した。また、被検動

物としては体重40~50gのICR雄性マウスを用いた。

【0036】羊赤血球を生理的食塩水で最終濃度が 4×10^8 個/mlになるように希釈し、この希釈液0.05mlをマウスの左足趾皮内に注射し、マウスを羊赤血球で感作した。

【0037】ついで、感作の4日後に、上記供試液0.1ml (抽出物量として20~25mg/kgマウス)を感作マウスに腹腔内投与した。

10 【0038】この供試液投与の直後に、羊赤血球 4×10^8 個/mlの0.05mlを感作マウスの右足趾皮内に再度注射してDTH反応を誘発した。

【0039】さらに、上記DTH反応誘発の6時間後に、上記供試液0.1ml (抽出物量として20~25mg/kgマウス)を同マウスに再度腹腔内投与した。

【0040】最後に2回目の供試液投与の18時間後に、マウスの右足趾の腫れ度合を肉眼的評点で調べた。

20 【0041】また、最終濃度10mg/mlの上記供試液のマウスへの投与量を0.2ml (抽出物量として40~50mg/kgマウス)とし、その他の点は上記操作と同様に行ってマウスの右足趾の腫れ度合を調べた。

【0042】また、最終濃度10mg/mlの上記供試液のマウスへの投与量を0.1ml (抽出物量として20~25mg/kgマウス)とした上記試験を別にもう一度行い、マウス右足趾の厚みを厚みゲージを用いて測定することにより、マウスの右足趾の腫れ度合を調べた。

30 【0043】この試験のコントロールとして、上記抽出物含有液の代わりに、溶剤抽出物を含まない上記ジメチルスルホキシド含有アラビアゴム水溶液を用い、その他の点は上記操作と同様に行って、マウスの右足趾の腫れ度合を調べた。

【0044】それぞれの試験(投与量20~25mg/kgマウス、投与量40~50mg/kgマウス、およびコントロール)は、それぞれ7匹のマウスを用いて行い、腫れの度合はこれらマウスについて得られた値の平均値をとった。

【0045】なお、コントロールは上記それぞれの試験毎にコントロール試験を行った。

40 【0046】この試験結果を図4、図5および図6にそれぞれ示す。

【0047】これらの図から明らかなように、実施例の溶剤抽出物を含有する供試液を投与した群では、同抽出物を含有しない溶液を用いたコントロール群に比べ、右足趾の腫れが明らかに抑制され、顕著なアレルギー性炎症抑制活性が認められる。

【0048】試験例3 (アジュバント関節炎に対する作用)

50 つぎの方法でラットアジュバント関節炎に対する上記溶剤抽出物の効果を調べた。

7

【0049】まず、試験例1と同様の方法で25mg/ml濃度の供試液を調製した。また、被検動物としては体重200から250gのウイスターイス雄性ラットを用いた。

【0050】流動パラフィンに0.6重量%の濃度で懸濁した結核菌体Mycobacteriumtuberculosis H37RA (Difco社製)の菌液アジュバント0.1mlをラットの右足蹠皮内に投与した。

【0051】その後、上記供試液をラットに2ml/kg (抽出物量として50mg/kg)の割合で当日より1日1回2日間、毎日腹腔内投与した。また、アジュバント投与日から23日間、毎日ラットの左右後肢の足蹠の容積をPlethysmometer (Ugo Basile社製)を用いて測定し、それらの容積の変化を調べた。

【0052】この試験のコントロールとして、上記抽出物含有液の変わりに、溶剤抽出物を含まない上記ジメチルスルホキシド含有アラビアゴム水溶液を用い、そのほかの点は上記操作と同様に行って左右後肢の足蹠の容積の変化を調べた。

【0053】それぞれの試験(供試液、コントロール)は、それぞれ5匹のラットを用いて行い、左右後肢の足蹠の容積はこれらラットについて得られた値の平均値をとった。

【0054】この試験結果を図7および図8に示す。

【0055】これらの図から明らかなように、実施例の溶剤抽出物を含む供試液を投与した群では、同抽出物を含む溶液を用いたコントロール群に比べ、左右後肢の足蹠の容積の増加が明らかに抑制され、アジュバント関節炎に対する顕著な有効性が認められる。

【0056】試験例4(毒性試験)つぎの方法で上記溶剤抽出物の毒性を調べた。

【0057】まず、実施例で得られた抽出物を、最終濃度が1000mg/5mlになるように、5重量%アラビアゴム水溶液にジメチルスルホキシドを5重量%添加してなる溶液に懸濁した。こうして得られた懸濁液を供試液とした。被検動物としては体重25~30gのICR雄性マウスを用いた。

【0058】上記供試液をマウスに5ml/kg(試験

8

例1、2の有効量の20~50倍量に相当)腹腔内投与した。その結果、毒性症状は特に認められず、また供試液投与2週間後の死亡率は0%であった。生存した被検動物の剖検においても何ら異常は認められなかった。この結果からも明らかなように、実施例で得られた抽出物是有効量の20~50倍量で毒性を示さなかった。なお、この試験は5匹のマウスを用いて行った。

【0059】

【発明の効果】本発明によれば、放線菌ストレプトマイセス・ノビリスの培養液またはその乾固物を有機溶剤によって抽出処理することによって、顕著なアレルギー性炎症抑制作用を示す活性成分を含む組成物を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】S.ノビリス培養液の抽出物含有液(20mg/kg)とそのコントロールの漏出色素量を示すグラフである(抗原注射から屠殺までの時間1時間)。

【図2】図2はS.ノビリス培養液の抽出物含有液(50mg/kg)とそのコントロールの漏出色素量を示すグラフである。

【図3】S.ノビリス培養液の抽出物含有液(20mg/kg)とそのコントロールの漏出色素量を示すグラフである(抗原注射から屠殺までの時間30分)。

【図4】S.ノビリスの抽出物含有液(20~25mg/kg)とそのコントロールの右足蹠の腫れ度合を示すグラフである(肉眼的評価)。

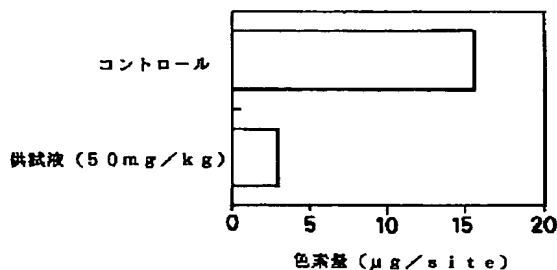
【図5】S.ノビリスの抽出物含有液(40~50mg/kg)とそのコントロールの右足蹠の腫れ度合を示すグラフである。

【図6】S.ノビリスの抽出物含有液(20~25mg/kg)とそのコントロールの右足蹠の腫れ度合を示すグラフである(右足蹠の厚みの測定)。

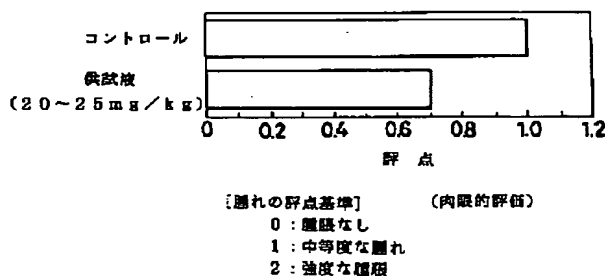
【図7】S.ノビリスの抽出物含有液(50mg/kg)とそのコントロールの右足蹠の容積を示すグラフである。

【図8】S.ノビリスの抽出物含有液(50mg/kg)とそのコントロールの左足蹠の容積を示すグラフである。

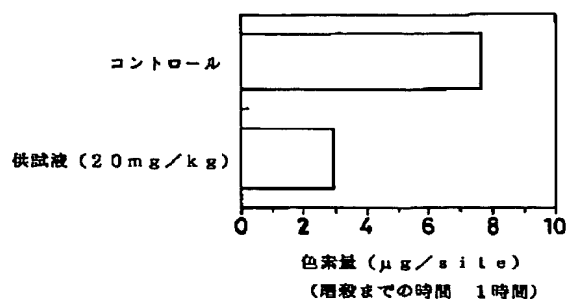
【図2】



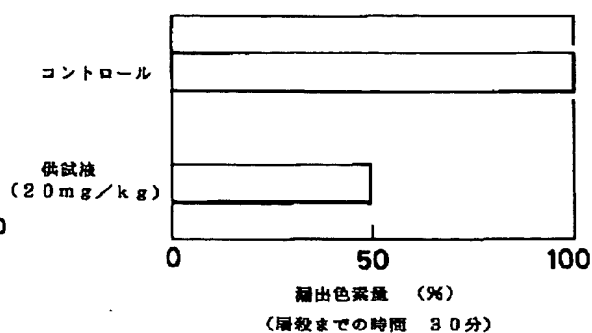
【図4】



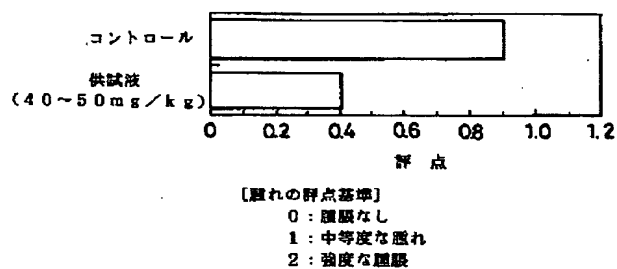
【図1】



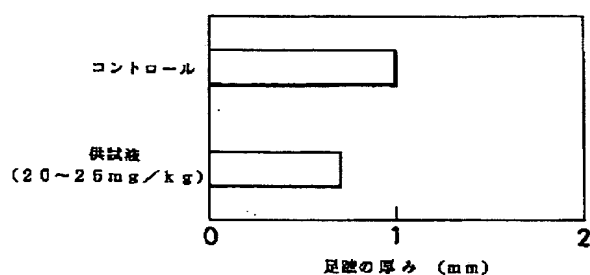
【図3】



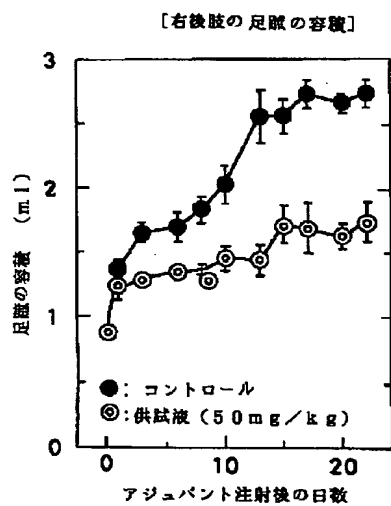
【図5】



【図6】



【図7】



【図8】

